

⑩ 日本国特許庁(J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-30000

⑬ Int. Cl.⁸

C 07 K 15/12

識別記号

Z N A

庁内整理番号

7731-4H

8717-4B

7236-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)1月31日

C 12 N 15/00

5/00

A

B *

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全21頁)

⑮ 発明の名称 組換ヒト肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平2-212818

⑰ 出 願 平2(1990)5月24日

⑱ 特 願 平2-134487の分割

優先権主張 ⑲ 平1(1989)6月5日 ⑳ 日本(J P)㉑ 特願 平1-142697

⑳ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号
㉑ 発 明 者 萩 屋 道 雄 滋賀県大津市陽明町3丁目4番地
㉒ 発 明 者 西 澤 勉 神奈川県相模原市富士見3丁目3-607
㉓ 発 明 者 関 達 也 滋賀県大津市北大路2丁目2番35号
㉔ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
㉕ 出 願 人 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号
㉖ 代 理 人 弁理士 高 島 一

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

組換ヒト肝実質細胞増殖因子

2. 特許請求の範囲

(1) 組換ヒト肝実質細胞増殖因子。

(2) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA。

(3) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクター。

(4) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体。

(5) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、該培養液から組換ヒト肝実質細胞増殖因子を採取することを特徴とする組換ヒト肝実質細胞増殖因子の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペ

プチド、さらに詳しくは、生体外(in vitro)で肝実質細胞の維持、増殖を可能にする生理活性を有する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、組換発現ベクター、形質転換体および該ポリペプチドの製造法に関するものである。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試薬、肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、肝癌の発癌研究用、さらに該ポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試薬、肝疾患治療薬などへの利用が期待出来る。

〔従来の技術〕

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとして、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、神経細胞増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞増殖因子(ECGF)などが知られている。これらの細胞増殖因子の他に、生体外において肝実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが1984年に中村らによって再生肝ラット血清より部分精製

され、肝実質細胞増殖因子（以下HGFと略す）と命名された。

このHGFの発見まで肝実質細胞は、各種の分化細胞が産生に増殖する哺乳動物血清の存在下でも該細胞の増殖が全く認められず、通常約1週間程度培養容器の壁からの脱落が起こり、生体外での長期培養は不可能であった。ところが、このHGFの存在下において肝細胞は極めて良好に増殖し、該細胞の培養が可能となった（Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1450, 1984）。他の研究者によっても、このHGF活性は、肝部分切除手術後の血中、劇症肝炎患者の血中にも存在することが確認された。その後、多くの研究者によって精製法、化学的性質、生物学的性質が明らかにされたが、このHGFあるいはHGFと同様の肝細胞増殖活性を有するポリペプチドのアミノ酸構成を同定するまでには至らなかった。

このような状況の下で、本発明者らは、先にラット血小板などの組織からHGFを分離精製して研究を重ね、この血小板由来のHGFは、2種の

サブユニットからなり、このHGFは生体外において肝実質細胞を極めて良好に増殖させることを見出すとともにHGFに含有される一部のアミノ酸配列27残基を同定することに成功した（特願昭63-311866号）。

（発明が解決しようとする課題）

生体内HGFは、肝臓、脳、肺臓、骨髄、心臓、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血液細胞などから極微量分泌されるポリペプチドであるため、原材料組織の入手、HGFの収量、安定供給など問題点が多い。このHGFを肝実質細胞の培養や肝細胞の研究用として利用するためには、その構造を明らかにしHGFあるいはHGFと同様な活性を有するポリペプチドを遺伝子組換え技術を用いて大量に供給することが望まれている。

（課題を解決するための手段）

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ラット肝臓mRNAより調製したcDNAライブラリーより、ラット血小板由来の

HGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ラットHGF β 鎖ポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。さらに、ラット由来の該cDNAの全部あるいはその一部をプローブとして、ヒト肝臓mRNAより調製されたcDNAライブラリーよりヒトHGFポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。また、ヒトの肝臓以外の臓器や血液細胞のcDNAライブラリーよりヒトHGF cDNAが得られることも見出した。さらに、該cDNAを含有する組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養してヒトHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換えヒト肝実質細胞増殖因子、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAを発現し得る組換え発現ベクター、該組換え発現ベクターで形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養し、該

培養物から組換えヒト肝実質細胞増殖因子を採取・製造する方法である。

本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードするDNA、組換え発現ベクター、および形質転換体は、例えば次のようにして調製される。

すなわち、(1)ラット肝細胞やラット巨核球などの動物組織よりmRNAまたは染色体DNAを単離し、常法に従ってcDNAライブラリーまたは染色体DNAライブラリーを作製し、(2)合成オリゴヌクレオチドプローブ、あるいは抗体を用いて篩査、例えばラットのHGFのcDNAまたは染色体DNAを単離するため、上記動物性、例えばラット由来のcDNAライブラリーまたは染色体ライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするcDNAまたは染色体DNAを抽出し、この動物性、例えばラット由来のHGFのcDNAまたは染色体DNAをプローブとして、ヒトの臓器あるいは血液細胞などのmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とす

るヒト由来HGFのcDNAを抽出する。また、本発明によって明らかにされたDNA配列あるいはヒトや動物のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドや本発明により得られたヒトHGF cDNAやヒトHGF染色体DNAなどをプローブに用い、またヒトまたは動物のHGFに対する抗体を用い、直接ヒトの臓器あるいは血液細胞などから抽出したmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするヒト由来のHGFのcDNAを抽出することもできる。(3)このヒト由来HGFのcDNAよりヒトHGFをコードするcDNA断片を制限酵素を用いて切り出し発現用ベクターに組み込み、(4)得られた組換え発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を得、(5)この形質転換細胞を培養して、その培養上清から本発明のヒトHGFを採取・製造することが出来る。さらに形質転換細胞中の組換え発現ベクターから制限酵素処理によって本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するD

NAを得ることが出来る。

以下、本発明の各工程について詳細に説明する。
(1)ヒトmRNAの単離とcDNAライブラリーの調製

動物、例えばラットまたはヒトのHGFをコードするmRNAはラットなどの動物またはヒトの肝臓、腎臓、心臓、膵臓、脳、骨髄、胎盤などの臓器あるいは白血球、巨核球やリンパ球などの血液細胞などから各々得ることが出来る。例えば、Biochemistry, 18, 5294 (1975)に記載されているJ. M. Chingvinらの方法によって、ラットなどの動物またはヒトの臓器あるいは血液細胞のグアニジンチオシアン酸溶液から得たRNAをさらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いる液体クロマトグラフィーに付すことによって該mRNAを調製することが可能である。

また、ヒト肝、脳、胎盤、白血球などのmRNAのような動物細胞や動物組織などの各種mRNAは、市販品としてクロンテック社などから購入して利用することも出来る。

これらのmRNAを誘型として逆転写酵素やポ

リメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR)を用いて、例えばH. Okayamaらの方法(Mol. Cell. Biol., 2, 161, 1982、およびMol. Cell. Biol., 3, 280, 1983)あるいはU. Gublerらの方法(Gene, 25, 263, 1983)あるいはM. A. Frohmanらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998, 1988)に従ってcDNAを合成し、このcDNAをプラスミドやファージなどに組み込むことによりcDNAライブラリーを調製することが出来る。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしては、大腸菌由来のpBR322(東洋紡績)、pUC18およびpUC19(東洋紡績)、枯草菌由来のpUB110(シグマ社)などがある。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、λgt10およびλgt11(東洋紡績)などがある。これらのベクターは、宿主細胞内に保持されて複製、増幅されるものであれば、ここに例示したものに限定されるものではない。

mRNAを誘型として合成されたcDNAをプラスミドまたはファージに組み込んでcDNAラ

イブラリーを調製する方法として、T. Maniatisの方法(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 239)またはT. V. Hyunhらの方法(DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985)を各々例示することが出来る。また、mRNAと同様に各種のcDNAライブラリーを市販品としてクロンテック社などから購入することが出来るのでそれらを利用することも出来る。

(2)cDNAライブラリーのクローニング:

cDNAライブラリーとして得られたプラスミドやファージなどの組換え発現ベクターは、大腸菌のような適切な宿主細胞に保持される。宿主となり得る大腸菌としては、例えばEscherichia coli NM514, C600(ストラタジェン社)、NM522, JM101(ファルマシア社)などを例示することが出来る。cDNAのベクターがプラスミドの場合、塩化カルシウム法、塩化カルシウム・塩化ルビジウム法などを用いて、またcDNAのベクターがファージの場合、インビトロパッケージング法などを用いてあらかじめ増殖させ

た宿主細胞に保持させることが出来る (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 249)。

このようにして得られた形質転換体から、ラットなどの動物またはヒトの肝実質細胞増殖因子の部分のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、このオリゴヌクレオチドを³²P標識して、プローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション法 (Gene, 10, 63, 1980)、ブラークハイブリダイゼーション法 (Science, 196, 180, 1977) などによって cDNA クローンを釣り上げることが出来る。また、目的とするポリペプチドに対する抗体を用いて、標識抗体法 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985) によって、cDNA クローンをクローニングすることも可能である。このようにしてクローン化された形質転換体は、ラットなどの動物またはヒト由来の HGF の全アミノ酸配列あるいはその部分のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する cDNA を含有している。

1 1

A を合成し、上記と同様にして cDNA ライブラリーから、すでに得られた第 1 の cDNA に連結しうる第 2 の cDNA を含有するプラスミドやファージなどの組換え DNA をクローニングすることが可能である。このプライマーエクステンションとクローニングの工程は、必要により複数回繰り返される。

(3) ヒト HGF 組換え発現ベクターの構築:

クローン化されたヒト HGF のアミノ酸配列の全部あるいはその 1 部をコードする cDNA を含有する数種のプラスミドやファージなどの組換えベクターから制限酵素によって cDNA を切り出し、ヒト HGF の発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素と DNA リガーゼを用いて再結合して組換え発現ベクターを構築することが出来る。

より詳しくは、本発明のヒト HGF を効率良く発現させるために組換え発現ベクターは転写の下流方向に順着に必要により (1) プロモーター、(2) リボソーム結合部位、(3) 開始コドン、(4) 本発明のヒト

次に該形質転換体から常法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) に従ってプラスミドやファージなどの組換え DNA を単離し、そのまま、あるいは制限酵素で消化してから cDNA 塩基配列が決定される。最初に得られたラットなどの動物またはヒト由来の cDNA をプローブとして、同様の方法によってヒトの臓器あるいは血液細胞由来の mRNA から調製された cDNA ライブラリーのクローニングを行うことが出来る。得られたラットなどの動物あるいはヒト由来の HGF の cDNA の塩基配列は、マクサムとギルバートの化学法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977) やサンガーのジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) などによって決定される。さらに、必要があれば、記述の mRNA と塩基配列の決定された cDNA の 1 部あるいはその cDNA の 1 部の配列を合成した DNA をプライマーにしてプライマーエクステンション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 731, 1979) によって新たに cDNA

1 2

HGF をコードする塩基配列を含有する DNA、(5) 終止コドン、(6) ターミネーターを含むように構築される。

本発明で用いることが出来る DNA のベクターとして、大腸菌由来のプラスミド pBR322, pUC18 (東洋紡績)、枯草菌由来のプラスミド pUB110 (シグマ社)、酵母由来のプラスミド pRB15 (ATCC 37062)、バクテリオファージ λ gt10, λ gt11 (ストラタジーン社)、ウイルス SV40 (BRLL社)、BPV (ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクターなどが列挙出来るが宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限定はない。特に、本発明のヒト HGF を簡便に発現させるには、SV40 のようなウイルスの遺伝子由来のベクターを用いるのが好ましい。

例えば、前述のクローン化されたヒト HGF をコードする DNA を SV40 ベクターの後期領域に結合した組換え発現ベクターは、COS 細胞 (Cell, 23, 175, 1981) と呼ばれるサル細胞株に導入して

1 3

1 4

発現させることが可能である。

プロモーターおよびターミネーターに関しても、目的とするヒトHGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。例えば、プロモーターとして、宿主が大腸菌である場合、*l*rpプロモーター、*l*acプロモーターなどを、宿主が枯草菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーターなどを、宿主が酵母である場合、GAPプロモーター、PGKプロモーターなどを、宿主がマウス線維芽細胞やチャイニーズハムスター卵巣細胞のような動物細胞の場合、ウイルス由来のSV40プロモーターやHSV1-TKプロモーターあるいはメタロチオネインプロモーターやヒートショックプロモーターなどを例示することが出来る。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、*l*rpターミネーター、*l*ppターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、*amy*Fターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、SV40

ターミネーター、HSV1-TKターミネーターなどを例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適切に組み合わせられる。

本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するDNAは、そのDNAが発現されるポリペプチドが、肝實質細胞増殖活性を有するならば特に制限はなく、例えば後述する第4図に示した塩基配列が例示され、さらには上記塩基配列の一部が置換、欠損、挿入、あるいはこれらが組み合わされた塩基配列を有するDNAであってもよい。本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有する該DNAの翻訳開始コドンとしてATG、翻訳終止コドンとしてTAA、TGA、あるいはTAGを有してもよい。また必要に応じて開始コドン、あるいは終止コドンを一つ以上組み合わせたり、他のコドンと組み合わせる配列してもよく、これらに特に限定はない。さらに、この組換え発現ベクターで形質転換した宿主の選択マーカーとなり得るアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐

15

性遺伝子、DHFR遺伝子など1種または2種以上が該ベクターの適切な位置に含有されていることが好ましい。

(4) 宿主細胞の形質転換とその培養

このようにして構築されたヒトHGF組換え発現ベクターは、コンピテント細胞法(J. Mol. Biol., 53, 154, 1970)、プロトプラスト法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978)リン酸カルシウム法(Science, 221, 551, 1983)DEAEデキストラン法(Science, 215, 166, 1982)、電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161, 1984)、インビトロパッケージング法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975)、ウイルスベクター法(Cell, 37, 1053, 1984)、またはマイクロインジェクション法(Exp. Cell. Res., 153, 347, 1984)などによって宿主に導入され、形質転換体が発現される。このとき、宿主として既述の大腸菌の株、枯草菌、酵母、動物細胞などが用いられる。特にマウス線維芽細胞C127(J. Virol., 25, 291, 1978)やチャイニーズハ

16

ムスター卵巣細胞CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216, 1980)などの哺乳動物由来の宿主細胞を用いるのが好適である。

得られた形質転換体は、目的とする組換えヒトHGFを産生させるためにその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の1例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日本製薬)、M9培地(J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972, p.431)などを、宿主が酵母の場合、YEPD培地(Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 1979, p.117)などを、宿主が動物細胞の場合、20%以下のウシ胎児血清を含有するMEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地(日本製薬)などを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常20℃～45℃、pHは5～8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合

17

18

は、ガラスビーズ、コラーゲンビーズ、あるいはアセチルセルロースフォローファイバーなどの担体が用いられる。これら以外の担地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

(5) ヒト HGF の精製：

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した組換ヒト HGF は、公知の塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外濾過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどを組み合わせて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィー、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィーの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、および抗 HGF 抗体セファロースアフィニティクロマト

グラフィーの組み合わせなどが好ましく有効な精製法である。

以上述べた方法によって得られた新規な組換ヒト HGF は、ラット肝およびラット胎小胞由来 HGF と同様ラット肝実質細胞の増殖を顕著に促進する活性を示した。

(HGF 活性の測定)

HGF 活性は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7229 (1983) に記載の方法に準じて次のように測定した。ウイスター系ラットからコラーゲナーゼ産法によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を 5% ウシ血清、 2×10^{-6} M インスリンおよび 2×10^{-6} M デキサメサゾンを含んだウィリアムス E 培地（フローラボラトリー社）に懸濁し、24 ウエルマルチプレートに 1.25×10^5 個/ウエルの濃度で播いた。5% CO₂、および 37°C、および 6.5% N₂ の存在下、37°C で 20 時間培養後、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアブロチニンを添加したウィリアムス E 培地に交換すると同時に所定量の試験試料を添加した。

1 9

15 時間後、 $1.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{125}I デオキシウリジン $10 \mu\text{M}$ /ウエルを添加した。コントロール群には、 ^{125}I デオキシウリジン添加の 15 分前に $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィディコリンを添加した。さらに 6 時間培養して ^{125}I でラベルした。細胞を pH 7.4 の PBS で 2 回洗浄後、冷 10% トリクロロ酢酸水溶液 (TCA) で固定した。細胞を 1 ウエル当たり 0.5 ml の 1 N 水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の 1 部をとってローリー法 (J. Biol. Chem., 193, 265, 1951) に従い蛋白量を測定した。試験試料を添加したとき肝実質細胞に取り込まれた ^{125}I の量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白量 1 μg 当たりに換算して、DNA 合成活性 (dpm/mg 蛋白質) とした。試験試料の HGF 活性は、同一試験において上皮細胞成長因子 (EGF) $10 \text{ ng}/\text{ml}$ を用いた時の肝実質細胞の DNA 合成活性の 50% に相当する活性を 1 単位と定義して表示した。

2 0

(発明の効果)

本発明によれば、肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする新規な生理活性ペプチドが提供される。本発明の組換ヒト HGF は、臨床診断薬や肝疾患治療薬として有用である。さらに本発明の組換ヒト HGF の作用により増殖維持される肝実質細胞は、例えば肝機能の基礎的研究用、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究用、肝癌の発癌研究用、あるいは肝炎ウイルスの生体外培養のための宿主細胞として極めて有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例)

実施例 1

(1) ラット肝臓 mRNA の単離：

ラット肝臓 mRNA は、グアニジンチオシアン酸法 (Biochemistry, 18, 5294, 1979) によって抽出し、オリゴ dT セルロースカラムクロマトグラフィー法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89,

2 1

2 2

1406, 1972) によって精製して調製した。市販食用植物油で煎炒した20%四塩化炭素をSDラット100g当たり1mlを腹腔内投与した。四塩化炭素投与の10時間後、肝臓を摘出した。得られたラット肝臓0.60gに5.5Mグアニジウム溶液(5.5Mグアニジンチオシアン酸、2.5mMクエン酸、0.5%ラウリルサルコシナトリウムからなるpH7.0の溶液)1.6mlを加えてホモジナイズした。0.1M EDTAを含む0.5Mトリフロロ酢酸溶液(1g/ml)1.7mlに上記のラット肝分散液1.6mlを重層し、ベックマン超遠心機、L8-55型によって85000g、20時間、20℃の条件下で遠心分離した。DNA層を除去した後、沈降したRNA層を1mlの滅菌した蒸留水に溶解した。このRNA水溶液から冷エタノール沈降によって6.24mgのRNAを得た。得られたRNAを1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)(以後、TE緩衝液と略する)0.5mlに溶解し、65℃、5分加熱処理した後、1M NaCl溶液0.5mlを加えた。0.1N

NaOHで活性化した後、0.5M NaClおよび1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(STE緩衝液と略す)で平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液0.5mlを注入した。約5mlのSTE緩衝液で洗浄後、TE緩衝液で吸着したポリ(A)RNAを溶出した。このポリ(A)RNA溶液500μlから冷エタノール沈降で得られたポリ(A)RNAは、再びTE緩衝液に溶解し、1μg/μlの濃度に調製した。

②ラット肝由来のcDNAライブラリーの作製

上記で得られたポリ(A)RNA、5μlを鋳型としてcDNA合成システム・プラス(アマシャム社)を用いて Gubler らの方法(Gene, 25, 263, 1983)に準じてcDNAを合成した。1本鎖cDNAの収量は、1018ng、2本鎖cDNAの収量は、1729ngであった。この2本鎖cDNAは、フェノール/クロロホルム(1:1, v/v)抽出とエタノール沈降によって精製した後、STE緩衝液に溶解し、約0.7μg/20μlの濃度に調製してから使用するまで-20℃で

23

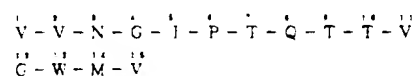
保存した。このcDNAは、cDNAクローニングシステムλgt10(アマシャム社)を用いて Huynh らの方法(DNA Cloning I, a practical approach, 1, 49, 1982)に準じ、次のようにλgt10のEcoRI部位にクローニングした。EcoRIメチラーゼを用いて上記のcDNA溶液の20μlをメチル化した後、T4DNAリガーゼを用いてcDNAの両末端にEcoRIリンカーを付加した。過剰のリンカーをEcoRI消化し、約100μlの反応液を得た。STE緩衝液で平衡化したcDNA精製用ゲル濾過カラムに上記反応液100μlを注入した。STE緩衝液で溶出してcDNA断片500μlを集めた。常法によってエタノール沈降を2回繰り返した後、減圧乾燥してリンカー付加cDNAを得た。再び、STE緩衝液に溶解して50ng/μlのリンカー付加cDNA26μlを調製した。あらかじめ準備されたλgt10アーム1μgにリンカー付加cDNA0.1μgをT4DNAリガーゼを用いて挿入した。この反応液は冷エタノール処理した

24

後、軽く乾燥し、得られた組換えDNAの全量を5μlのTE緩衝液に溶解した。この組換えDNAをインビトロパッケージング反応に供し、λgt10組換えファージを得た。ファージプレートイング用大腸菌を用いたタイトレーションにより測定したcDNA1μgから得られた組換えファージ数は、 5.0×10^4 個であった。このようにして作製したcDNAライブラリーは、使用するまで少量のクロロホルムを加えたSTE緩衝液(100mM NaCl, 10mM MgSO₄, および0.01%ゼラチンを含む20mMトリス塩酸緩衝液, pH7.5)中、4℃で保存した。

(3)DNAプローブの合成

本発明者が見出した下記ラットHGFβ遺伝子末端アミノ酸配列15個



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファン、Mはメチオニンを示す)

25

26

をコードする塩基配列を推定し、オリゴヌクレオチド

' ACCATCCA:CC:AC:ISTIGT:IGTIGG:AT:CC:TT:AC:AC' (Iはイノシンを意味す)

をDNAシンセサイザー381A(アプライドバイオシステムズ社)により合成した。得られたオリゴヌクレオチドをアポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績)を用いて(γ - 32 P)ATP(アマシャム社)により標識してDNAプローブを作製した。

(4)ラットHGF遺伝子DNAの部分単離とその塩基配列の決定

上記(2)で得られた約 5×10^5 個の組換えファージを 37°C で15分間約 8×10^5 個の大腸菌N M514(ストラタジーン社)に感染させた後、約 50°C に加温した0.7%の寒天を含むLB培地 270ml に添加し、 $23\text{cm} \times 23\text{cm}$ のLB寒天培地プレート6枚に均一に流延した。空气中、 37°C で12時間培養後、ブランクの生じたプレート

上にニトロセルロースフィルターを約30秒間密

着させた。このニトロセルロースフィルターを 1.5M NaCl および 0.1N NaOH からなるアルカリ溶液に5分間浸漬し、さらに 0.2M トリス塩酸緩衝液($\text{pH}7.5$)、 2.5mM リン酸緩衝液($\text{pH}7.5$)、 2mM EDTA および $2 \times \text{SSC}$ 緩衝液からなる中性溶液に15分間浸漬した。風乾後、 60°C で2時間熱処理してニトロセルロースフィルターに各ブランクのDNAを固定化した。得られたニトロセルロースフィルターは、 $6 \times \text{SSC}$ 緩衝液、 $5 \times$ デンハート溶液、 50mM PIPES、および 100mM リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.0$ 、からなるハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、 65°C で5時間前処理した。 100°C で5分間熱処理した上記(3)の ^{32}P 標識合成オリゴヌクレオチド(約 $8 \times 10^5\text{cpm}$)プローブとサケ精巢DNA(0.1mg/ml)の混合溶液を添加し、 45°C で16時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ニトロセルロースフィルターは 50°C で 0.1% SDSを含む $6 \times \text{SSC}$ 緩衝液に

よって3回洗浄してから風乾した。このニトロセルロースフィルターを増感スクリーン、ライトニングプラス(デュボン社)とX線フィルム、RX(富士写真フィルム)に密着させ、 -80°C で30時間露光した。得られた3個の陽性ブランクを採取し、上記と同じ方法によって2次スクリーニングを行い、得られた1個の陽性クローンをRBC1と命名した。このRBC1ファージを常法により増殖させ、RBC1 cDNAを単離精製した。得られたcDNAの塩基配列は、シーケネース(ユナイテッド ステート バイオケミカル社)を用いてジデオキシ法によって決定した。第1図にRBC1 cDNAの全塩基配列を示す。RBC1 cDNAは、ラットHGF β 銀をコードする塩基配列(1番目から689番目)を含有する。

(5)ヒトHGF遺伝子DNAの単離と塩基配列の決定

ヒト正常肝臓mRNA(クロンテック社) $5\mu\text{g}$ を鋳型にして上記(2)と同様にしてヒト肝由来のcDNAを合成した。1本鎖cDNAの収量は、

1100ng であった。得られたcDNAの 200ng をアガロース電気泳動に供し、分離した4~7kbのcDNAをジーンクリーン(パイオ101社)で抽出した後、上記(2)と同様にしてcDNAライブラリー(1)を調製した。cDNA $1\mu\text{g}$ から 2×10^5 個の組換えファージを得た。マルチプライムDNA標識システム(アマシャム社)を用いて(α - ^{32}P)dCTPで標識したRBC1 cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーション反応温度および洗浄温度を 60°C 、洗浄液は 0.1% SDSを含む $2 \times \text{SSC}$ 緩衝液とした以外は(4)と同様に、ヒト肝由来cDNAライブラリー(1)の1次スクリーニングおよび2次スクリーニングを行い、陽性クローンHBC25を得た。HBC25ファージから常法により単離、精製したHBC25 cDNAを塩基配列解析および制限酵素切断解析に供した。第2図(a)にHBC25 cDNAの制限酵素地図、第3図(a)にHBC25 cDNAの塩基配列の一部を示す。次にHBC25 cDNAに含有する $^{\text{r}}$ TCAATAATCTT

TCAAAGTCT³の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザー381A(アブライバイオシステムズ社)により合成した。この合成DNA 0.75 μ gをプライマーとし、ヒト肝mRNA 20 μ gを鋳型としてcDNA 0.4 μ gを合成し、同様にしてcDNAライブラリー(Ⅱ)を調製した。このcDNAライブラリー(Ⅱ)から(α^{32} P)dCTPで標識したHBC25 cDNAの0.7 kb EcoRI断片をプローブにして陽性クローンHAC19を得た。第2図にHAC19 cDNAの制限酵素地図、第3図にHAC19 cDNAの塩基配列の一部を示す。このようにして得られたHBC25 cDNAおよびHAC19 cDNAの塩基配列を組み合わせ、ヒトHGFコード領域の全塩基配列およびその塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列を第4図に示す。ヒトHGFの全cDNA塩基配列から、ヒトHGFの翻訳開始コドンは1番目のATGであり、終止コドンは2185番目のTAGと推定される。これらの開始および終止コドンの間のヒ

トHGFのcDNA塩基配列は728アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードし、1番目のMetに続くアミノ酸配列はLeuに富み、31番目のGlyまでがHGF分泌のためのシグナル配列であった。同様にヒトHGF β 鎖のN末端は、495番目のValと推定される。また、ヒトHGFの鎖鎖の結合部位は、Asn-x-Ser/Thrのアミノ酸配列を有する264番目、402番目、566番目、および653番目のAsnと推定される。

第4図に示すヒトHGFのアミノ酸配列をコンピュータによりホモロジー検索を行った結果、ヒトHGFはプラスミノゲン、プラスミン、カリクレインや凝固因子XIIなどのセリンプロテアーゼとホモロジーをもつことが見出された。即ち、ヒトHGFはその α -鎖にクリングル構造と推定される配列を4箇所持っており、またその β -鎖は上記セリンプロテアーゼのプロテアーゼ領域に類似している。しかし、セリンプロテアーゼの活性中心と推定されているSerとHisがヒ

31

トHGFの β -鎖ではTyr(673番目)とGln(534番目)にそれぞれ置換されている。
(6)サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築:

サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターpEUK(hHGF1)の構築図を、第5図に示す。上記(5)で得られたHAC19ファージDNAを制限酵素BamHIとScaIで消化し、アガロース電気泳動により0.9 kbのDNA断片を分離・精製した。同様にHBC25ファージDNAを制限酵素ScaIとSmaIで消化し、2.1 kbのDNA断片を分離・精製した。これらのDNA断片をあらかじめ制限酵素BamHIとSmaIで消化したブルスクリプトKSM13+(ストラタジーン社)と混合し、T4 DNAリガーゼで結合してプラスミドpBS(hHGF1)を得た。得られたpBS(hHGF1)を制限酵素XbaIとSmaIで消化した。制限酵素XbaIとSmaIであらかじめ消化したCOS細胞用発現ベクターpEUK-C1(クロンテック社)と3.0

32

kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼで結合してヒトHGF発現ベクターpEUK(hHGF1)を得た。

(7)サルCOS細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子の発現:

得られたpEUK(hHGF1)プラスミドをエタノール沈殿した後、10 mM PBS緩衝液に溶解し、20 μ g/ μ lに調製した。次に、10% ウシ胎児血清(ギブコ社)を含むDMEM培地(日本製薬)中で増殖させた対数増殖期のCOS-1細胞(ATCC CRL-1850)を10 mM PBS緩衝液で2回洗浄した後トリプシン処理した。同緩衝液で3回洗浄後、細胞濃度 2×10^7 個/ μ lになるように再び同緩衝液に浮遊化した。先に調製したプラスミド溶液250 μ lと細胞浮遊液250 μ lを混合し、氷冷下で10分間放置した。この氷冷したプラスミド・細胞混液に高電圧パルス遺伝子導入装置ZA-1200(PDS社)を用いて、印加電圧4 kV/cm、パルス時間20ミリ秒の条件下で高電圧パルスを加えた。得

33

34

られた細胞を上記の培地で希釈し、37℃、5% CO₂存在下に2日間培養した。培養3日目の培養上清中のHGF活性を前述のラット肝実質細胞を用いて測定したところ、50単位/μlであった。

一方、HGF cDNAを挿入していない発現ベクター、pEUK-CIを同じ方法によりCOS-1細胞に導入して培養したが、その培養上清中には、HGF活性を認めなかった。

実施例2

(1)マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築

マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターpBPM-T(hHGF II)の構築図は、第6図に示す。実施例1で得られたHAC19ファージDNAを制限酵素BamHIとScaIで消化し、アガロース電気泳動により0.9 kbのDNA断片を分離・精製した。同様にHBC25ファージDNAを制限酵素ScaIとPstIで消化し、2.1 kbのDNA断片を分離・精製した。これらのD

NA断片をあらかじめ制限酵素BamIとPstIで消化したブルースクリプトKS II-(ストラタジーン社)と混合し、T4 DNAリガーゼで結合してプラスミドpBS(hHGF I)(隆工研産物第11050号)を得た。プラスミドpBPM-Tを制限酵素EcoRVで消化後、組換えアルカリフォスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、プラスミドpBS(hHGF II)(隆工研産物第11050号)を制限酵素XbaIとSalIとNaeIで消化したT4 DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した3.0 kbのDNA断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたヒトHGF発現ベクターpBPM-T(hHGF II)は、MT-1プロモーターとSV40初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にヒトHGF遺伝子を有し、この発現ベクターによるマウスC127細胞の形質転換は、ウシバビロウイルス(BPV)遺伝子により行われる。また形質転換された細胞の選択は、トランスポゾンTn5のneo

35

遺伝子(Gene. 19, 327, 1982)にヘルペスシンプレックスウイルスタイプ1のチミジンキナーゼ(HSV-1 TK)遺伝子由来のプロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したneoキメラ遺伝子によっても可能となる。

(2)マウスC127細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子の発現

ヒトHGF発現ベクターpBPM-T(hHGF II)は、Wiglerらの方法(Cell. 11, 223, 1977)によりマウスC127細胞へ導入した。

上記(1)で得られた20 μgのpBPM-T(hHGF II)プラスミドを0.5 M塩化カルシウム240 μlに溶解し、20 mM HEPES、280 mM NaClおよび1.5 mMリン酸ナトリウムからなる2×HEPES緩衝液(pH7.1)、240 μlを覆拌しながら加えた。室温で30分覆拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈殿を形成させた。あらかじめ、10%ウシ胎児血清(ギブコ社)および10 mMグルタミンを添加したDMEM培地(日本薬業)を用いて5×10⁵個の

36

C127細胞を5% CO₂の存在下で37℃、24時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈殿を加え、室温で20分放置した。さらに37℃で4時間インキュベートした後、培地を除去し、15%グリセリンを添加した1×HEPES緩衝液を加え室温で5分放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換し、さらに37℃で2日間インキュベートした。細胞を10倍に希釈して1 ml/mlのG418(シグマ社)を含む同培地を用いて5% CO₂の存在下で37℃、7日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株から培養上清中のHGF活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングしヒトHGF高産生株BPH88を得た。この細胞の培養上清中のHGF産生能は、2.3万単位/μl/日であった。

実施例3

(1)チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築

チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF発現ベクターpEVSVE(hHGF II)の構

37

38

露区は、第7図に示す。プラスミドpEVSV Eを制限酵素EcoRVで消化後、酸性アルカリフォスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、実施例2で得られたプラスミドpES(hHGF II)(発工研産第11050号)を制限酵素XbaIとSalIとNaeIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した3.0 kbのDNA断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたヒトHGF発現ベクターpEVSV E(hHGF II)は、SV40初期プロモーターとSV40の初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にヒトHGF遺伝子を有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウスDHFR遺伝子にSV40初期プロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したDHFRキメラ遺伝子により可能となる。

(2)チャイニーズハムスターCHO細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子の発現:

ヒトHGF発現ベクターpEVSV E(hHGF

II)は、実施例2と同様にしてチャイニーズハムスターCHO細胞のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)欠損CHO-DUX細胞に導入した。得られた細胞株は、リボヌクレオシドとデオキシヌクレオシドを含まず、選択した10%ウシ胎児血清(ギブコ社)と1%グルタミンと50nMメソトレキセートを含む α -MEM培地(フローラボラトリー社)を用いて培養した。発生したコロニーは、安定なヒトHGF高産生株を得るために、同培地において18世代まで増殖させた。得られた細胞株は、安定にヒトHGFを産生し、CHO-1と名付けた。この細胞のヒトHGF産生量は、3.1万単位/1/日であった。

実施例4

実施例2で得られたヒトHGF産生マウスC127組換え細胞株BHP89の培養上清液より組換えヒトHGFを精製した。

(1)陽イオン交換クロマトグラフィー

BHP89株の培養液400mlに、終濃度0.01%となるようにTween 80を添加し、ステリペク

スHVフィルター(日本ミリポア・リミテッド)により濾過した。この濾液に1/20容の1MTriis・HCl(pH8.5)緩衝液を加え、緩衝液A(50mM Triis・HCl、10mM Hepes、2mM CaCl₂、150mM NaCl、0.01%Tween 80、pH8.5)で平衡化したS-セファロースFF(ファルマシア社製、カラムサイズ内径1.6cm、高さ5cm)に添加した。緩衝液Aで未吸着物質を洗浄後、0.15Mから1.0MのNaClによる直線濃度勾配(全量100ml)で、吸着物を溶出した。クロマトパターンを第8図に示す。HGF活性をもつ画分を集め、S-セファロース溶出液とした。

(2)アフィニティクロマトグラフィー

S-セファロース溶出液を1N酢酸でpH7.5に調整後、2倍容の0.01%Tween 80を含む蒸留水で希釈し、緩衝液B(10mM Triis・HCl、0.3M NaCl、0.01%Tween 80、pH7.5)で平衡化したヘパリン・セファロースCL-6B(ファルマシア社製、カラムサイズ内径

1cm、高さ3cm)に添加した。緩衝液Bでカラムを洗浄後、0.3Mから2.0MのNaClによる直線勾配(全量30ml)により溶出した。そのクロマトパターンを第9図に示す。HGF活性をもつ画分を集め、ヘパリン溶出液とした。

(3)逆相HPLC

0.1%TFA(トリフルオロ酢酸、v/v%)を含む蒸留水で平衡化したC4 RP-304カラム(バイオラッド社製、内径4.6mm、高さ250mm)にヘパリン溶出液を添加し、0.1%TFAを含む0%から80%へのアセトニトリルの濃度勾配により溶出を行った。組換えヒトHGFは約40%のアセトニトリル濃度にて溶出させた。そのクロマトグラムを第10図に示す。精製された組換えヒトHGFの収量は約25 μ gであり、培養上清液からの活性回収率は約25%であった。

(4)SDSポリアクリルアミド電気泳動

前記3段のクロマトグラフィーで精製された組換えヒトHGFを2-メルカプトエタノール還元下及び非還元下SDS-ポリアクリルアミド電気泳

動にかけた。結果を第11図に示す。精製組換HGFは、非還元条件(2-ME(-))では分子量7万~8万の単一バンドを示し、還元条件下(2-ME(+))では、分子量6万~7.5万の α 鎖と分子量3万~4万の β 鎖に分かれた。即ち、組換HGFは α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーであることが示された。また β 鎖が2本のバンドに分離し、 β 鎖に付加される糖鎖の本数に差のあることを示した。

(5) α 鎖および β 鎖のN末端アミノ酸配列

精製組換HGFの α 鎖と β 鎖を分離し、それぞれのN末端アミノ酸配列を調べた。精製製品を4Mグアニジン存在下に60℃、30分間処理し、2-メルカプトエタノールにて還元した。次いでモノヨード酢酸ナトリウムを添加して、SH基をアルキル化し、反応液をマイクロボンドスフェアC4カラム(ウォーターズ社)による逆相HPLCにかけ、 α 鎖と β 鎖を分離した。検出は0.1%TFAを含む水とアセトニトリルによった。このようにして得られた α 鎖と β 鎖をプロテインシ

ークエンサーにかけた結果、下記に示すアミノ酸配列が得られた。

α 鎖 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 His Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu
 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu Ile

β 鎖 1 2 3 4 5 6 7
 Val Val Asn Gly Ile Pro Thr

これらの配列は第4図のHGFコード領域の全塩基配列より推定されたアミノ酸配列の32~51番目および455~501番目に一致した。

(6) アミノ酸組成および糖組成

精製組換HGFを0.2%フェノールを含む6N HClにて110℃、24時間処理して加水分解し、アミノ酸分析機にかけ、アミノ酸組成を調べた。その結果は下表に示したように、DNA塩基配列より推定したアミノ酸組成値と精製組換製品による実測値は非常によく一致した。

(以下空白)

4 3

アミノ酸	蛋白質1mol当たりの各アミノ酸数	
	DNA配列からの計算値	実測値
Lys	47	46
His	24	24
Arg	43	42
Asp	85	80
Thr	41	38
Ser	38	38
Glu	60	56
Pro	45	43
Gly	57	57
Ala	22	22
Cys	40	()
Val	33	35
Met	15	17
Ile	40	37
Leu	38	38
Tyr	32	31
Phe	18	18
Trp	18	()

(実測値の()はこの分析方法では測定できないことを意味する。)

さらに精製組換HGFを2.5N TFA中で、110℃、5時間加熱処理し、陰イオン交換樹脂を用いたHPLCにて糖分析を行った。その結果、アスパラギン配糖体特有のマノース、ガラクトース、フコース、N-アセチルガラクトサミンが検出され、組換HGFは糖蛋白質であることが確認された。

4 4

4 4

(7) 組換ヒトHGFの肝細胞増殖活性

ラット初代培養肝実質細胞は、現在知られているin vitroの系の中では最もin vivoに近い肝機能を持つ系である。「HGF活性の測定法」に記載した方法に従って得たラット肝実質細胞に対し、精製した組換ヒトHGFを添加したところ、1 ng/mlの濃度で強い細胞増殖を誘起し、10 ng/mlでその効果は最大に達した。この培養系に増殖活性を示す因子は他にもインスリンやEGFがあるが、組換ヒトHGFは単独で両者よりも強い活性を有し、かつこれら3者の共存下では相加的な作用を示した。従って、組換ヒトHGFは現在知られている因子のなかでは、生体外肝細胞に対し最も強力な増殖活性をもつ物質ということができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、RBC1 cDNAの塩基配列を示す。第2図は、HBC25 cDNAの制限酵素地図(a)およびHAC19 cDNAの制限酵素地図(b)を示す。第3図は、HBC25 cDNAの塩基配列の一部(a)及びHAC19 cDNAの塩基配列の一部

図を示す。第4図は、ヒトHGFコード領域の塩基配列とアミノ酸配列を示す。第5図は、サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築図を示す。第6図は、マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築図を示す。第7図は、チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築図を示す。第8図は、S-セファロース抽出液のフラクションと抽出成分の吸光度およびそれらのDNA合成活性との関係を示す線図である。第9図は、ヘパリン抽出液のフラクションと抽出成分の吸光度およびそれらのDNA合成活性との関係を示す線図である。第10図は、逆相HPLCにおいて、過酸化したアセトニトリル濃度と、抽出した成分の吸光度との関係を示す線図である。第11図は、複製組換ヒトHGFの還元下および非還元下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンを示す。

特許出願人 東洋紡績株式会社

同 中 村 敏 一

代 理 人 弁 理 士 高 島 一

47

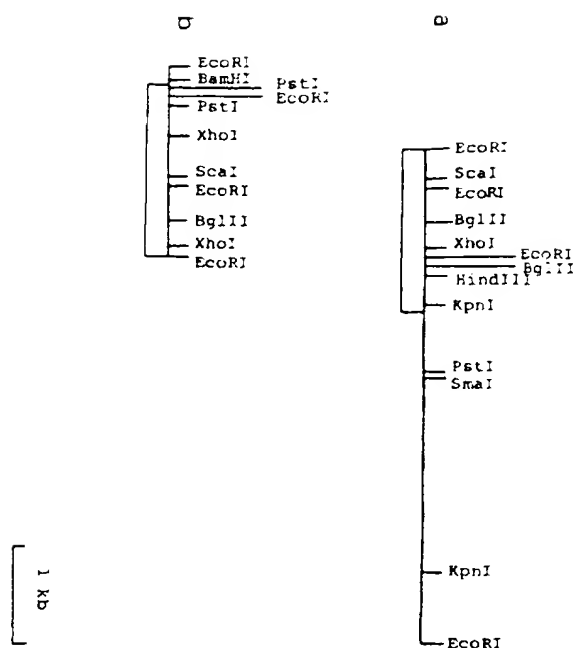
```

GAATT CCGTGTGAGG GTTGGGATTC GCAGTACCCC -481
CACAAAGCATG ACATCACTCC CGAGAACTTC AAATGCAAGG ACCTTAGAGA AAATTATTGC -421
CGCAATCCGG ATGGGGCTGA ATCACCATGG TGTTTTACCA CTGATCCAAA CATCCGAGTT -361
GGTACTGCT CTCAAAATCC CAAATGTGAC GTGTCAAGTG GACAAGATTG TTATCGTGGC -301
AATGGGAAAA ACTACATGGG CAAGTTATCC AAAACAAGGT CTGGACTCAC ATGTTCCATG -241
TGGGACAAGA ATATGGAGGA TTTACACCGT CATATCTTCT GGGAGCCAGA CGCTAGCAAG -181
TTGACTAAGA ATTACTGCGG GAACCCCGAT GACGACGCCC ATGGACCTTG GTGCTACACA -121
GGGAATCCTC TCGTTCTTGG GGATTATTGC CCTATTTCCT GTTGTGAAGG AGATACTACA -61
CCTACAATTG TCAATTTGGA CCATCCTGTA ATATCCTGTG CCAAAACAAA ACAACTGCGA -1
GTTGTAATG GCATTCCAAC ACAANCAACA GTAGGGTGGG TGGTTAGTTT GAAATACAGG 60
AATAAACACA TCTGTGGGGG ATCATTGATA AAGGAAAGTT GGGTTCTTAC TGCAAGGCCAA 120
TGTTTTCCAG CTAGAAACAA AGACTTGAAA GACTATGAAG CTGGCTTGG AATCCATGAT 180
GTCCATGAGA GAGGCGAGGA GAAACGCCAA CAGATCTTAA ACATTTCCTG GCTAGTCTAT 240
GGACCTGAAG GCTCAGATTG GCTTTTACTG AAGCTTGCTC GCGCTGCAAT CCTGGATAAC 300
TTGTGCAGTA CAATTGATT ACCTAGTTAT GGCTGTACAA TCCCTGAAAA GACTACTTGC 360
AGTATTTACG GCTGGGGCTA CACTGGATTG ATCAACGCAG ATGGTTTATT ACGAGTAGCT 420
CATCTGTATA TTATGGGGAA TGAGAAATGC AGTCAGCACC ATCAAGGCCAA GGTGACTTTG 480
AATGAGTCTG AATTATGTGC TGGGGCTGAA AAGATTGGAT CAGGACCTTC TGAGGGAGAT 540
TATGGTGGCC CACTCATTTG TGAACAACAC AAAATGAGAA TGGTTCTTGG TGTCAATTGT 600
CCTGGTGGTG GATGTGCCAT CCCAAATCGT CCTGGTATTT TTGTTCCAGT AGCATATTAT 660
GCAAAATGGA TACACAAAGT AATTTTGACA TACAAGTTGT AATAGCCATA GAAGAGGCCA 720
GTGTATTGTA AGCATCCATG GATACAGGAA GATTTCCAAG ACTTCAGGAT TAAATGTCA 780
CCTAAACCAA TCCTAAACA ACTACTTGAG TGTGTGAGT GTTCAGATAC TCATTATAT 840
ATGTGGCGTT TTCTGTTGAA AAAAAAAAAA AAAAAAGAA TTC

```

第1図

第2図



```

TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAAGTTGAA AAGCAATC CAGAGGTACC CTACGAAGTC 600
GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAC ATTTGTCCAG CCAATGGGGA GAGTTATCGA 660
CACCGGGACA AATTCTTGCC TGAAGATAT CCGGACAAGG GCTTTGATGA TAATTATTCG 720
CGCAATCCCG ATGGCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCCTCA CACCCGCTGG 780
GAGTACTGTG CAATTAAAC ATGCCGTGAC AATACTGTAA ATGATACTGA TGTTCCTATG 840
GAAACAACCTG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGCGCACTCC CAATACCATT 900
TGGAATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGCAT TCTCAGTATC CTCACAAGCA TCACATCACT 960
CCTGAAAAAT TCAAGTGCAA GGACCTACGA GAAAATTACT GCCGAAATCC AGATGGGTCT 1020
GAATCACCCT GGTGTTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGTTACTG CTCCCAAAAT 1080
CCAACTGTGT ATATGTCAA TGGACAAGAT TGTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1140
GGCAACTTAT CCCAAACAA ATCTGGACTA ACGTGTTCAT TGTGGAACAA GAACATGGAA 1200
CACTTACACC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1260
CGAAATCCAG ATGATGATGG TCATGGACCC TGGTGCTACA CGGGAATCC ACTCATTCCT 1320
TGGGATTATT GCCCTATTTC TCGTTGTCAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTTA 1380
GACCATCCTG TAATATCTTG CGCCAAAACG AACAACCTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCGA 1440
ACACGACAAA ATGTAGGATG GATGATTAGT TTGAGATACA GAAATAACA TATCTGGGGA 1500
GGATCATTCG TAAAGGAAAG TTGGGTTCCT ACTGCCAGAC AGTGTTCCTC TTCTCGAGAC 1560
TTGAAAGATT ATCAGGCTTG GCTTGGAAAT CATGATGTCC ATGGAAGAGG AGAGAGAGAA 1620
CGCAACAGG TTCTCAATGT TTCCGAGCTG GTATATGGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1680
TTAATGAAGC TTGCCAGACC TGCTGTCTCG GATGATTTTG TTAATACAAT TGATTTACCT 1740
AATTATGGAT GCACAATTCC TGAAGAGACC AGTTGCAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1800
GGATTGATCA ACTATGATGG TCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATCAG 1860
AAATGCCGCC AGCATCACC GAGGAAGGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1920
GCTGAGAGAG TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTTTGTGAG 1980
CANCATAAAA TGAGAATGGT TCTTGTGTCT ATTGTTCCCG GCCGTGGATG CGCCATTCCA 2040
AATCGTCTCG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCCA AATGGATACA CAAATATTAT 2100
TTAACAATA AGGTACCACA GTCATACCTG AAGTAAGTGT GTCTGAAGCA CCCACCAATA 2160
CAACTGTCTT TTACATGAAG ATTTACAGCA ATGTGGAAAT AAAAAACCA CTTACAACAA 2220
TCTTAAGACA ACTACTGGAG AGTCATGTTT GTTAAATTC TCATTAAATG TTAATGGGTG 2280
TTCTGTGTGT TTGTTTGTG AGTGTATTAT TGTCAATCTT GAAGTGAATT AAGGTACATG 2340
CAAGTGTAGT AACATATCTC CTGAAGATAC TTCAATGGAT TAAAAAACA CACAGGTATA 2400
ATTGCTGGAT AAGATTTTTC TGGGGAAGAA ATCAATTAAT CTCTCTAAGC TGCCTTCTGA 2460
GGTGGTTTC TTAATAATGA CTAAACATA AATTAAATGT TATTTTAACT TCACCAAAAC 2520
AATTATATCC TTGTGTCCTT AAATTGTACC CTATATTAAT TTATATTACA TTTTATATGC 2580
TATATGTTAT AGTTCATTCA TTCTCTTCCA CCAATGTATC TGCAATACTG GTACACGAAC 2640
ACACTTTTAA CAAACACACA TACCATGTA CACATGCCCTA GGTACACATG TACATGCAC 2700
ACAGTTTAAA TTATGATGTA CTTAATGTAA CCTCTAAATA TTTTACAAGT ATGTACCTAT 2760
AGTTTACCTT CAAAAAATA GAAATCTCTA AAGACCGAGT GAAATATTAA AATATGATGC 2820
AAAAACAATA TGAGTGGCTA ATCTCCATA CGTAATCTGC AGATGATCTT CTCTGGTTGA 2880
CATTTTACCT GTGGCCATCA CCGCGGG

```

第2図(a)

第 4 図 (1)

ATG TGG CTC ACC AAA CTC CTG CGA GGC CTG CTG CTG GAG CAT CAT CTC CTC	48
Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu	15
CTG CAT CTC CTC CTG CTC GGC ATC GGC TAT GCA GAG GCA CAT	96
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Gln Gln His	30
AAG AAA AGA AAT ACA ATT GAC GAA TTC AAA TCA GCA AAG ACT	144
Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Gln Phe Lys Lys Lys Ser Ala Lys Thr	45
ACC GTA ATC AAA ATA CAT GCA GCA CTG AAG ATA AAA ACC AAA AAA GTG	192
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Val	60
AAT ACT GCA GAC GAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGC AAT AAT GCA GTT	240
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Asn Gln Gly	80
GCA TTC ACT TGC AAG GGC TTT GTT TAT AAA GCG AGA AAA CAA TGC	288
Pro Phe Thr Lys Lys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys	95
CTC TGG TTC CCC TTC AAT AGC ATG TCA ACT GGA GTG AAG AAA GAA TTT	336
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Phe	110
GCG CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC	384
Gly His Gln Phe Asp Leu Tyr Gln Asn Lys Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys	125
ATC ATC GGT AAA GCA GCG AGC TAC AAG GCA ACA GTA TCT ATC ACT AAG	432
Ile Ile Gln Lys Gly Arg Lys Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys	140
AGT GCG ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAG GAA CAG	480
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Gln His	160
ACC TTT TTG CCT TGG AGC TAT CCG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC	528
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Gln Asn Tyr	175
TGT CCA AAT CCT CGA GGG GAA GAA GCG GCA CCC TGG TGT TTC ACA AGC	576
Cys Arg Asn Pro Arg Gln Gly Gln Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser	190
AAT CCA CAG GTA CCG TAC GAA GTC TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA	624
Asn Pro Gln Val Arg Tyr Gln Val Cys Asp Ile Pro	205

第 4 図 (2) ~ 続く

ATGTGGTGA CCAAACTCT GCGAGCCCTG CTGTCGAGC ATGTCTCTCT GATCTCTCTC	60
CTGCTCCGA TGGCCATCC CTATGAGAG GACATRAGA AAGAAGAAA TAAATTCAC	120
GAATCAAAA AATCAGAAA GACTACCTTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAGATGAAA	180
ACCAAAAG TGAATCTGC AGACCAATGT GCTAATAGT GTACTAGGAA TAATGGACTT	240
CAATTCACCT CGAAGCCCTT TGTCTTGTAT AAGCCGAGAA AACAATGGCT GTGGTTCCGC	300
TTCAATAGCA TGTCACTGG ACTGAGAAA GAATTTGCC ATCAATTTGA CCTCTATGA	360
AACAGACT ACATTAGAAA TGGCATCAT GGTAAAGCAG CAGCTACAAA GGCAGAGTA	420
TCTATCACTA AGATGGGCTT CAATATGTCAG CCTGGAGTT CGATGATACC AACAGACAC	480
AGCTTTTGG CTTCAGCTTA TGGGGGTAAA GACCTACAGG AAGCTACTG TCGAATCCT	540
CGAGGGAAG AAGGCGGACC CTGCTTTTC ACAGCAATC CAGAGCTAGC CTACGAGTC	600
TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGGA GAGTTATCGA	660
GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTGTGAGC GCTGGGATCA TCAGACACCA	720
CACCGGACA AATCTTGGC TGAAGATAT CCGGACAGG GCTTTGATGA TAATTATTGC	780
GGCANTGCC ATGCCNCCC GAGGCCATGG TGTATATCTG TTGACCTCA CACCGCTGG	840
GACTACTGTG CAATTAAAC ATGGGCTGAC AATAGTGTAA ATGATCTGA TCTTCTATG	900
GAACAACTG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAGGCTACA GGGGCACTGC CAATACCAT	960
TGGATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGAT TCTCATGTC CTCACAGCA TCACATCACT	1020
CCTGAAATTT TGAATGCAA GCACTACGA GAATATTCT CCGGAAATCC AGATGGGTCT	1080
GAATCACTCT GGTCTTTTAC CAGTGATCCA AATATCCGAG TTGTTACTG CTCGCAATTT	1140
CGAACTCTG ATATGTCAA TCGACAAGAT TGTATGCTG GGAATGGCAA AATATATG	1200
GGCACTTAT CCAACAGAG ATCTGACTA AGCTGTTCAT TGTGACAAA GAATATGAA	1260
GACTTACCC GTCATATCTT CTGGGACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC	1320
CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGAGCC TGGTGCTACA CCGGAATCC ACTCATCTT	1380
TGGCATTTT GCGTATTTT TCTTTGTAA GGTGATACCA CAGCTACAT ACTCAATTTA	1440
GACCATCTG TAAATCTTG GCGCAAAAG AACAACTGC GAGTTCTAAA TGGATTTGCA	1500
ACAGCAACA ATGTAGATG GATGATTAG TTGAGTACA GAATAAACA TATCTGGCA	1560
GGATCATTTA TAAAGGAAG TTGGTCTCT ACTGCAGGAC AGTGTCTCC TTCTGAGAC	1620
TTGAAGATT ATGA	

第 3 図 (b)

表 4-30000(2)

GTT GAA TGC ACC ATG GGC GAG AGT TAT CCA GGT CTC ATG GAT Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp 210 215 220	672
CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Glu Arg Trp Asp His Glu Thr Pro 225 230 235 240	720
CAC CGG CAC AAA TTC CCG GAA AGA TAT CCC GAC AAG GCG TTT GAT His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp 245 250 255	768
GAT AAT TAT TGC CGC AAT CCC GAT GGC CAG CGG AGG CCA TGG TGC TAT Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Tyr 260 265 270	816
ACT CTT GAC GCT CAC ACC CGC TGG GAG TAC TGT CCA ATT AAA ACA TGC Thr Leu Asn Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys 275 280 285	864
GCT GAC AAT ACT GTA AAT GAT ACT GAT GTT CCG ATG GAA ACA ACT GAA Ala Asp Asn Thr Val Asn Asp Thr Asp Val Pro Met Glu Thr Thr Glu 290 295 300	912
TGC ATC GAA GGT CAA GGA GGC TAC AGG GGC ACT GGC AAT ACC ATT Cys Ile Glu Gly Cln Glu Gly Tyr Arg Glu Thr Ala Asn Thr Ile 305 310 315 320	960
TGG AAT GCA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC AAG Trp Asn Gly Ile Pro Cys Glu Arg Trp Asp Ser Glu Tyr Pro His Lys 325 330 335	1008
CAT GAC ATG ACT CCG GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CCA GAA AAT His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn 340 345 350	1056
TAC TGC CCA AAT CCA GAT GGG TGT GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr 355 360 365	1104
GAT CCA AAC ATC CCA GAT GGT TAC TGC TCC CAA ATT CCA AAC TGT GAT Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Cln Ile Pro Asn Cys Asp 370 375 380	1152
ATG TCA AAT GCA CAA GAT TGT TAT CCG GGC AAT GGC AAA AAT TAT ATG Met Ser Asn Gly Cln Asp Cys Tyr Arg Gly Asp Gly Lys Asn Tyr Met 385 390 395 400	1200
GCG AAC TTA TCC CAA ACA AGA TGT GCA ACE TGT TCA ATG TGG AAC Gly Asn Leu Ser Glu Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asn 405 410 415	1248

表 4-30000へ続く

表 4-30000(3)

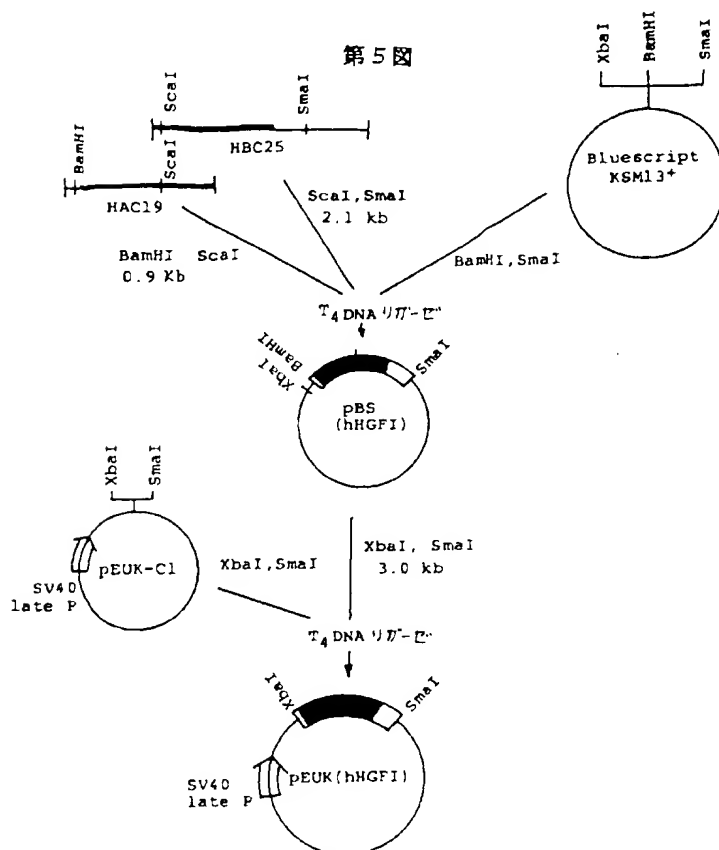
MAG AAC ATG GAA GAC TTA CAC CGT CAT ATC TTC TGC GAA CCA GAT GCA Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Thr Trp Glu Pro Asp Ala 420 425 430	1296
ACT AAG CTC AAT AAG AAT TAC TGC CCA AAT CCA GAT GAT GCT CAT Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His 435 440 445	1344
GCA CCG TGG TGC TAC ACG CCA AAT CCA CTC ATT CCG GAT TAT TGC Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys 450 455 460	1392
CCT ATT TCT CCG TGT GAT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA Pro Ile Ser Arg Cys Gly Gly Asn Thr Thr Phe Thr Ile Val Asn Leu 465 470 475	1440
GAC CAT CCG GTA ATA TCT TGC CGC AAA ACG AAA CAA CTG CGA GTT GTA Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Glu Leu Arg Val Val 480 485 490 495	1488
AAT GCG ATT CCA ACA CCA AAT GTA CCA TGC ATC ATT AGT TTG ACA Asn Gly Ile Trp Thr Arg Thr Asn Asn 500 505	1536
TAC ACA AAT AAA CAT ATC TGC CCA GGA TCA TTC ATA AAG GAA ACT TGC Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Leu Trp 510 515 520 525	1584
GTT CTT ACT CCA CCA CAG TGT TTC CCG TCT CCA GAC TTG AAA CAT TAT Val Leu Thr Ala Arg Glu Cln Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr 530 535 540 545	1632
GAG CCG TGC CTT GGA ATT CAT GAT GTC CAT GCA AGA CCA GAG CAG AAA Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly Glu Glu 550 555 560	1680
CGC AAA CAG CTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GCG CCT GAA GGA Arg Lys Glu Val Leu Asn Val Ser Glu Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly 565 570 575 580	1728
TCA GAT CTC GTT TTA ATG AAG CTT GCG AGA CCT GCT CTC GAT GAT Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp 585 590 595	1776
TTT GTT AAT ACA ATT GAT TTA CCT AAT TAT TGC TGC ACA ATT CCT GAA Phe Val Asn Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu 600 605 610	1824
AAG ACC ACT TGC ACT GTT TAT GCG TGG GCG TAC ACT GCA TTC ATC AAC Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn 615 620 625	1872

表 4-30000へ続く

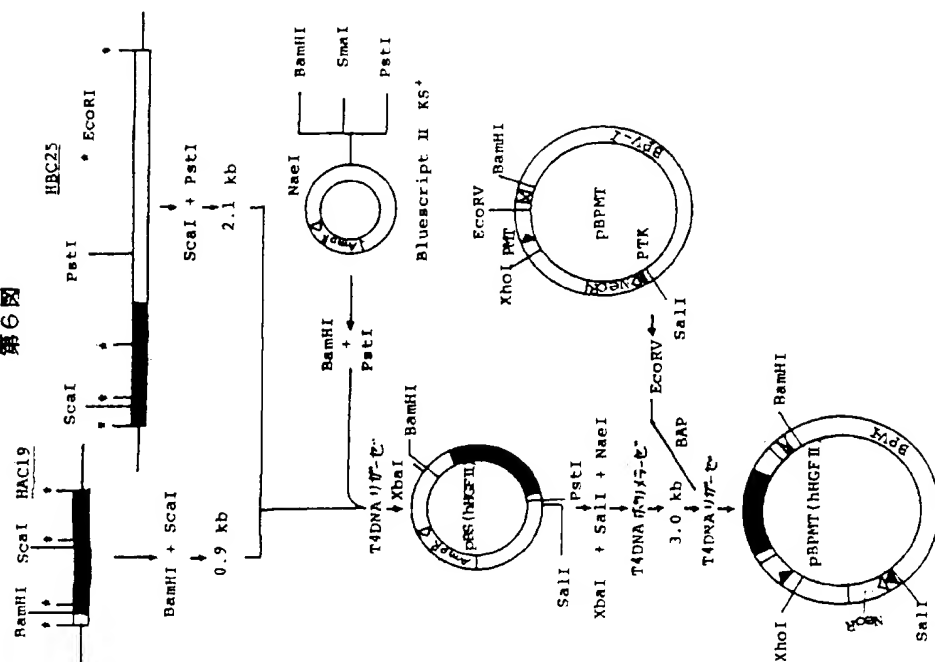
第4図(4)

TAT GAT GGT CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG 1920
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu 625
 AAA TGC AGC CAC CAT CAC CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA 1968
 Lys Cys Ser Gln His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu 645
 ATA TGT GCT GGG GCT GAG AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG CAT 2016
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp 660
 TAT GGT CGC CCA CTT GTT TGT GAG CAA CAT AAA ATG ACA ATG GTT CTT 2064
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu 675
 GGT GTC ATT GTT CCC GGC GGT GGA TGC GCC ATT CCA AAT CGT CCT GGT 2112
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly 690
 ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TCG ATA CAC AAA ATT ATT 2160
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile 705
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *** 725

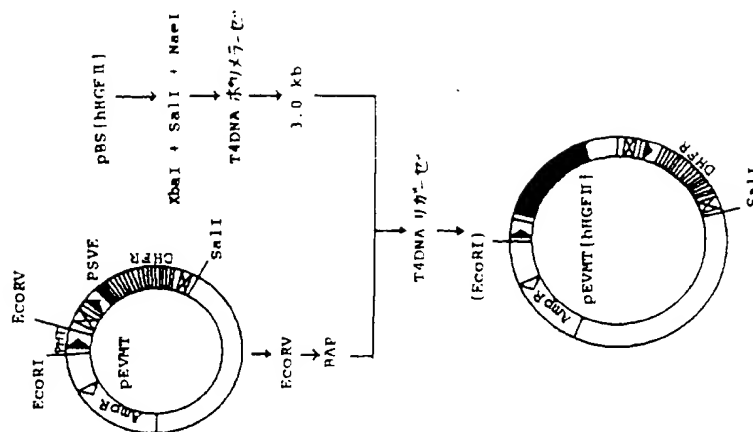
第5図



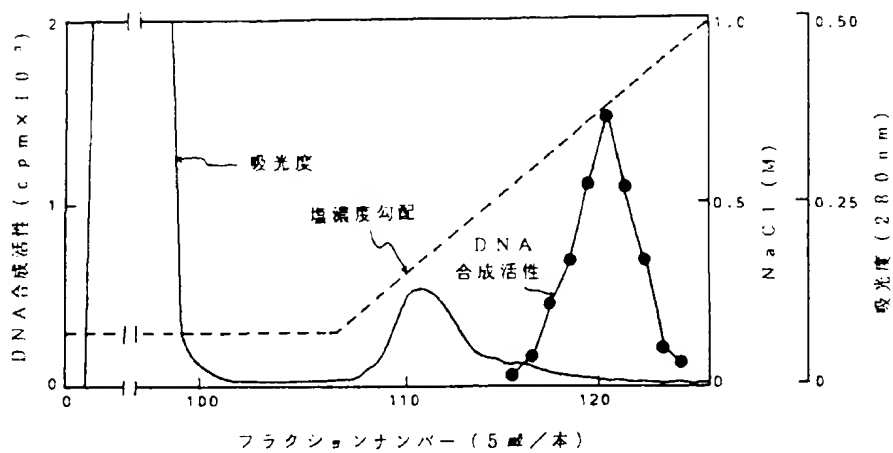
第6図



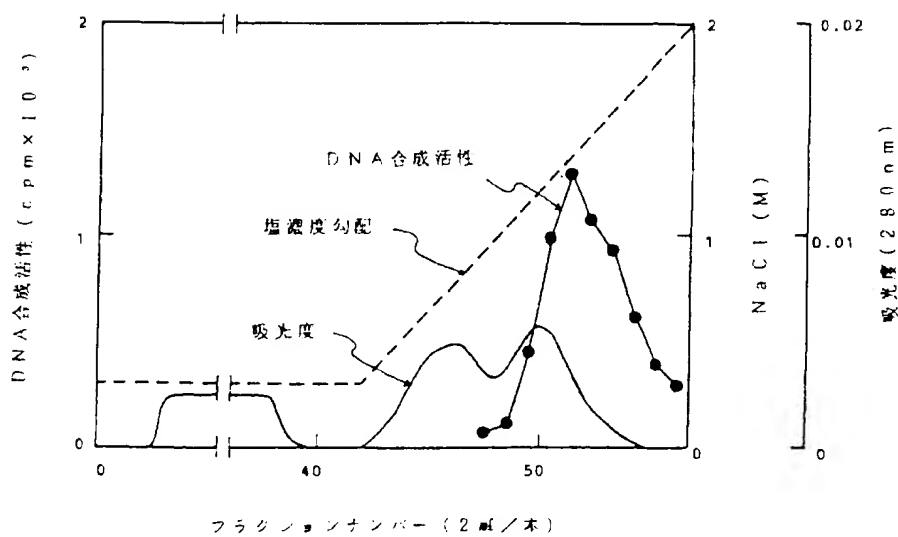
第7図



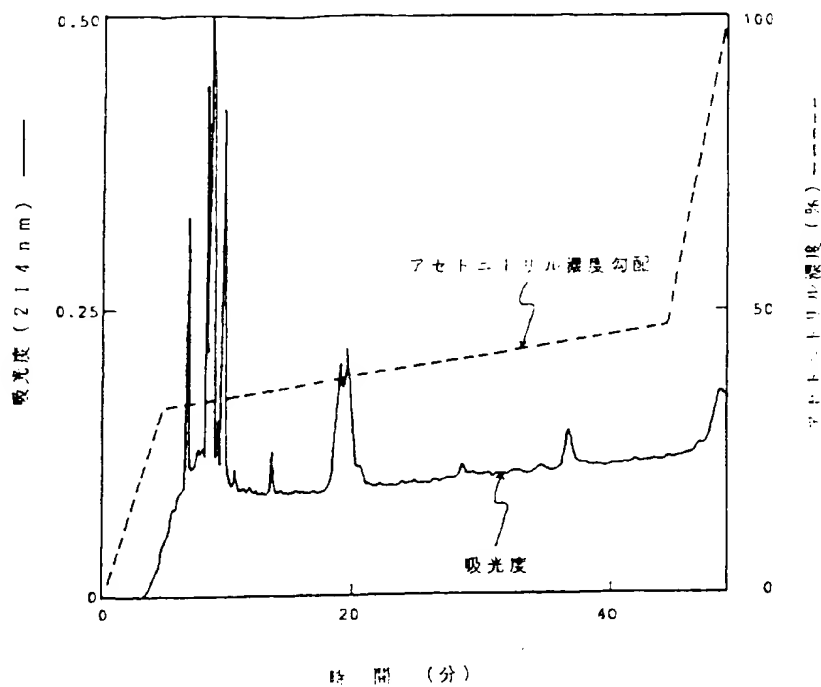
第8図



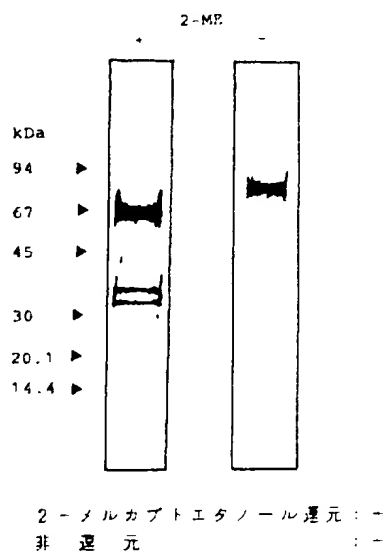
第9図



第10図



第11図



第1頁の続き

⑥Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
C 12 N 5/10		
15/16		
C 12 P 21/02	H	8214-4B
// A 61 K 37/02	ACS	8317-4C
39/395	D	8829-4C
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者 下 西 学 滋賀県大津市桜野町1丁目20番36号 グリーンベル西大津
A-203

⑧発明者 清水 伸 京都府京都市左京区高野東開町1-23 27棟303号